

(19)



Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11)

EP 1 475 431 A1

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(43) Veröffentlichungstag:

10.11.2004 Patentblatt 2004/46

(51) Int Cl.7: **C12N 1/16, C12N 1/26**

(21) Anmeldenummer: **04010064.6**

(22) Anmeldetag: **28.04.2004**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR
HU IE IT LI LU MC NL PL PT RO SE SI SK TR**

Benannte Erstreckungsstaaten:

AL HR LT LV MK

(30) Priorität: **07.05.2003 DE 10320653**

(71) Anmelder: **Cognis Deutschland GmbH & Co. KG
40589 Düsseldorf (DE)**

(72) Erfinder:

- **Thonart, Philippe
5081 Saint-Denis (BE)**

• **Destain, Jacqueline**

1450 Chastre (BE)

• **Moreau, Benoit**

7022 Hyon (BE)

• **Fickers, Patrick**

4200 Liège (BE)

• **Weekers, Frédéric**

4122 Plainevaux (BE)

• **Molitor, Jean-Pierre**

77760 Buthiers (FR)

• **Weiss, Albrecht, Dr.**

40764 Hilden (DE)

(54) **Verfahren zur Produktion von Lipase**

(57) Vorgeschlagen wird ein Verfahren zur Produktion von extrazellulärer Lipase durch Kultivierung von Mikroorganismen, bei dem der Gehalt an Lipase durch Zugabe von Fettsäureestern kurzkettiger einwertiger Alkohole als Induktoren erhöht wird sowie die Verwen-

dung von Fettsäureestern kurzkettiger einwertiger Alkohole als Induktoren zur Produktion von extrazellulärer Lipase.

EP 1 475 431 A1

Beschreibung

Gebiet der Erfindung

[0001] Die Erfindung befindet sich auf dem Gebiet der mikrobiellen Produktion von Enzymen, speziell der Lipase und insbesondere der Lipase aus Hefen und betrifft ein Verfahren zur Produktion von extrazellulären Lipasen aus Mikroorganismen, insbesondere aus Hefen. Des Weiteren betrifft die Erfindung die Verwendung von Fettsäureestern als Induktoren zur Produktion von Lipase aus Mikroorganismen.

Stand der Technik

[0002] In der chemischen und biochemischen Synthese werden vermehrt Enzyme als Katalysatoren eingesetzt. So werden in vielen Fällen aufgrund der oft milderen Reaktionsbedingungen bereits in großtechnischen Verfahren Hydrolasen, speziell Lipasen (EC 3.1.1.3) zur Fettspaltung eingesetzt.

Diese Enzyme werden von unterschiedlichen Mikroorganismen produziert. Zur Isolierung der Enzyme folgt nach der Fermentation der Mikroorganismen ein aufwendiges Reinigungsverfahren.

Der Effektivität dieser Katalysatoren stehen oftmals die hohen Kosten der Produktion und der Isolierung gegenüber, so dass Forschungsgruppen immer wieder bestrebt sind die Ausbeuten an Enzymen zu erhöhen oder die Kosten der Produktion durch kostengünstige Nährmedien bei der Fermentation oder vereinfachte Isolierung so gering wie möglich zu halten. Eine Möglichkeit die Ausbeute an Enzymen zu erhöhen besteht darin, aus dem natürlichen Mikroorganismus durch Mutagenese Mutanten zu züchten bei denen eine erhöhte Produktion beobachtet werden kann. Zur Mutagenese eignen sich sowohl biologische als auch chemische Verfahren. Der Nachteil bei dieser Art der Ausbeuteerhöhung liegt in der aufwendigen und langwierigen Suche nach einer geeigneten Mutante. Eine weitere, heute oftmals verwendete Methode besteht darin, die Mikroorganismen genetisch zu verändern und gezielt bestimmte Promotoren der codierenden Gene zu induzieren. Ein Nachteil bei diesem Verfahren ist die mangelnde Akzeptanz genetisch veränderter Prozesse und die Ablehnung von Produkten aus genetisch veränderten Prozessen. Oftmals beschrieben und aus der Literatur bekannt ist die Möglichkeit Tenside, Fette und Öle wie Olivenöl, Sojaöl, Acylglyceride wie beispielsweise beschrieben in EP 385 401 dem Fermentationsmedium beizumischen um die Produktion an Lipasen zu steigern. Bei diesen Verfahren ist die Ausbeutesteigerung oftmals zu gering.

[0003] Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung hat nun darin bestanden, eine kostengünstige Variante zu finden um die Ausbeute an Lipase bei natürlichen Mikroorganismen oder bei deren Mutanten zu erhöhen.

Beschreibung der Erfindung

[0004] Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Produktion von extrazellulärer Lipase, durch Kultivierung von Mikroorganismen bei dem der Gehalt an Lipase in Kulturüberständen durch Zugabe von Fettsäureestern kurzkettiger einwertiger Alkohole als Induktoren erhöht wird.

[0005] Überraschenderweise wurde gefunden, dass die Zugabe von Fettsäureestern kurzkettiger einwertiger Alkohole als Induktoren die Produktionsrate an extrazellulärer Lipase bei der Kultivierung von Mikroorganismen erhöht.

Bei den zu kultivierenden Mikroorganismen des erfindungsgemäßen Verfahrens handelt es sich in einer bevorzugten Ausführungsform um Hefen und insbesondere um *Yarrowia lipolytica*, *Hansenula canadensis*, *Mucor javanicus*, *Mucor miehei*, *Penicillium roqueforti*, *Rhizopus delemar*, *Penicillium expansum* und *Candida pseudotropicalis* wobei *Yarrowia lipolytica* besonders bevorzugt ist. In einer weiteren besonderen Ausführungsform der Erfindung handelt es sich bei den zu kultivierenden Hefen entweder um den Wildtyp oder um Mutanten. Ein bevorzugter Wildtyp ist der Stamm *Yarrowia lipolytica* CBS 6303. Die Herstellung der Mutanten kann nach chemischen oder biologischen Methoden erfolgen und wird bevorzugt durch N-methyl-N'-nitrosoguanidin vorgenommen wie es von Roblain et al. 1989 in *Belg. J. Food Chem.* 44; 79-82 beschrieben wurde. Zur Produktion der erfindungsgemäßen Lipase findet bevorzugt die Mutante *Yarrowia lipolytica* LGX 6481 Anwendung.

[0006] Im Sinne der Erfindung handelt es sich bei extrazellulärer Lipase um fettspaltende Enzyme die von Mikroorganismen produziert werden und aus dem Zellinneren in das Fermentationsmedium geschleust werden. Die Lipase wird nach bekannten Methoden isoliert und gereinigt. Bevorzugt folgt nach der Fermentation eine Zentrifugation des Nährmediums, sodass sich die extrazelluläre Lipase im Überstand befindet. Eine besonders bevorzugte Lipase im Sinne der Erfindung wird vom Wildtyp und von Mutanten der Hefe *Yarrowia lipolytica* produziert. Die erfindungsgemäße Lipase ist bevorzugt glycosyliert und hat ein Molekulargewicht zwischen 35.000 und 40.000 Dalton, insbesondere zwischen 37.000 und 38.000 Dalton und bevorzugt von 37.664 Dalton. Die bevorzugte Lipase kann in mindestens drei unterschiedlichen isomeren Formen vorliegen deren isoelektrische Punkte bei 5,0; 5, 2 und 5,4 liegen. Die bevorzugte Lipase hydrolysiert eine Vielzahl an Triglyceriden und Fettsäureestern und hydrolysiert insbesondere Ölsäureester.

In Sinne der Erfindung versteht man unter Kultivierung von Mikroorganismen die Fermentation in Schüttelkolben und/oder Fermentern unterschiedlicher Größe wobei Fermenter im 2 l, 20 l und 500 l Maßstab bevorzugt sind. Der Fermentation im Fermenter ist eine Vorkultur in Schüttelkolben von beispielsweise 250 ml mit bevorzugt 50 ml Kulturmedium vorgeschaltet. Diese Vorkul-

turen werden dann zur Animpfung des Fermentationsmediums verwendet. Das Fermentationsmedium der Vorkultur besteht bevorzugt aus Glucose, Hefeextrakt und Pepton in veränderlichen Gewichtsanteilen und 5 % v/v Inoculum. Die Vorkultur wird bevorzugt 16 h bei 250 rpm und bei 29 °C inkubiert. Das Fermentationsmedium des Fermenters besteht bevorzugt aus Malzextrakt, CaCO₃, MgSO₄, K₂HPO₄, Urea, Sojabohnenmehl und Olivenöl in veränderten Gewichtsanteilen mit 5 % v/v Inoculum. Es können im Sinne der Erfindung jedoch auch andere Bestandteile für die Fermentation eingesetzt werden, insbesondere solche, die speziell für die Kultivierung von Hefen Anwendung finden und bevorzugt kostengünstig sind. Die Fermentationsbedingungen sind den jeweiligen Fermentern angepasst und variieren je nach Größe und Hersteller der Fermenter. Bevorzugt wird die Hauptkultur 27 h bei 29 °C und einem pH-Wert von 7 kultiviert. Beschrieben werden die Fermentationsbedingungen auch in: Destain et al, 1997. Biotechnology Letters 19, 2, 105-107.

[0007] Im Sinne der Erfindung versteht man unter Induktoren solche Verbindungen, die nach Zugabe zur Fermentation die Produktion eines bestimmten Enzyms oder Metaboliten erhöhen. Die Induktoren werden bevorzugt je nach Bedarf des Mikroorganismus im fed-batch Verfahren zugegeben damit eine zu hohe Konzentration des Induktors zu Beginn der Fermentation ausgeschlossen werden kann, da diese toxische Auswirkungen auf den zu kultivierenden Mikroorganismus haben können. Als Induktor zur Erhöhung der Produktionsrate der erfindungsgemäßen Lipase wurden nun überraschenderweise Fettsäureester kurzkettiger einwertiger Alkohole gefunden, die ausgewählt sind aus der Gruppe die gebildet wird von Ester der Ölsäure, Ester der Linolsäure, Ester der Linolensäure und Ester der Stearinsäure. Bevorzugt handelt es sich um Methyl-oleat, Ethyl-oleat, Methyl-oleat, Ethyl-oleat, Methyl-oleat, Ethyl-oleat, Methyl-oleat, Ethyl-oleat und insbesondere Methyl-oleat beispielsweise Agrimul® ME 2231F der Firma Cognis GmbH & Co KG. Die erhöhte Produktionsrate wurde bestimmt durch Messung der Aktivität der Lipase durch Spaltung von Olivenöl einer bestimmten Emulsion bei pH 7 und 37 °C. Die molekulare Aktivität wird angegeben als Umsatz des Substrates in micromol pro Enzymmenge (micromol) und Zeit (min). Eine Enzymeinheit U/ml (enzyme units) ist definiert als Enzymmenge, die pro Minute ein micromol Substrat umsetzt.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden die Induktoren zwischen 0,5 und 2,5 % v/v bezogen auf das Fermentationsmedium eingesetzt, wobei ein Gehalt von 0,5 % v/v oder 1,0 % v/v, oder insbesondere 2,5 % v/v bevorzugt ist. Die Induktoren können allein oder in Gemischen von zwei oder mehreren Estern eingesetzt werden wobei die jeweiligen Mengenanteile variieren können. Bevorzugt ist die Verwendung eines einzigen Esters und besonders bevorzugt die Verwendung von Methyl-oleat oder

Ethyl-oleat. Durch den Einsatz der Induktoren kann die Aktivität der Lipase von 1000 U/ml bis zu 2500-3000 U/ml in der Fermenterlösung gesteigert werden.

Da es sich bei den erfindungsgemäßen Induktoren um Fettsäureester handelt, ist eine bevorzugte Ausführungsform der Erfindung ein Verfahren, bei dem der verwendete Induktor gleichzeitig als Kohlenstoffquelle bei der Kultivierung dient und damit an die Stelle der im Fermentationsmedium enthaltenen Fettsäuren, Fette oder Öle wie beispielsweise Ölsäure oder Gemische mit überwiegendem Anteil an Ölsäure tritt und diese ersetzt. In diesem Fall werden die Fettsäureester als Kohlenstoffquelle in Mengen zwischen 2,5 % v/v bis 5 % v/v eingesetzt.

Im Sinne der Erfindung versteht man unter Fettsäureester kurzkettiger einwertiger Alkohole solche Ester, deren Alkohole eine C-Kettenlänge von 1 bis maximal 4 haben, wobei die Alkohole nur einwertig sind, die C-Ketten jedoch auch verzweigt sein können und die Alkohole damit nicht nur primär, sondern auch sekundär oder tertiär sein können. Es handelt sich also um Methyl-, Ethyl-, Propyl-, Butyl-, Isopropyl-, 2-Butyl- oder tert. Butylester wobei die Methyl- und die Ethylester bevorzugt sind. Das fed-batch Verfahren wird insbesondere angewendet bei Ethyl-oleat als Induktor, da das bei der Hydrolyse entstehende Ethanol für die Hefe toxisch wirkt. Durch das fed-batch Verfahren wird jeweils nur soviel Ethyl-oleat in das Fermentationsmedium gegeben, dass die Produktion des Enzyms angeregt wird, die Menge an Ethanol jedoch noch nicht toxisch auf den Mikroorganismus wirkt.

[0008] Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung von Fettsäureestern kurzkettiger einwertiger Alkohole als Induktoren zur Produktion von extrazellulärer Lipase aus Mikroorganismen. Bei den verwendeten Fettsäureestern handelt es sich bevorzugt um Ester, ausgewählt aus der Gruppe, die gebildet wird von Ester der Ölsäure, Ester der Linolsäure, Ester der Linolensäure, Ester der Stearinsäure, speziell Methyl-oleat, Ethyl-oleat, Methyl-oleat, Ethyl-oleat, Methyl-oleat, Ethyl-oleat, Methyl-oleat, Ethyl-oleat und insbesondere um Methyl-oleat, beispielsweise Agrimul® ME 2231F der Firma Cognis GmbH & Co KG. In einer besonderen Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verwendung handelt es sich bei den Mikroorganismen um Hefen und speziell um *Yarrowia lipolytica*, *Hansenula canadensis*, *Mucor javanicus*, *Mucor miehei*, *Penicillium roqueforti*, *Rhizopus delemar*, *Penicillium expansum* und *Candida pseudotropicalis* wobei *Yarrowia lipolytica* besonders bevorzugt ist. In einer weiteren besonderen Ausführungsform der Erfindung handelt es sich bei den zu kultivierenden Hefen entweder um den Wildtyp oder um Mutanten.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Produktion von extrazellulärer Lipase

- durch Kultivierung von Mikroorganismen, **dadurch gekennzeichnet, dass** der Gehalt an extrazellulärer Lipase in Kulturüberständen durch Zugabe von Fettsäureestern kurzkettiger einwertiger Alkohole als Induktoren erhöht wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, dass** es sich bei den zu kultivierenden Mikroorganismus um Hefen handelt.
 3. Verfahren nach Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet, dass** es sich bei den zu kultivierenden Hefen um Hefen handelt, ausgewählt aus der Gruppe, die gebildet wird von *Yarrowia lipolytica*, *Hansenula canadensis*, *Mucor javanicus*, *Mucor miehei*, *Penicillium roqueforti*, *Rhizopus delemar*, *Penicillium expansum* und *Candida pseudotropicalis*.
 4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet, dass** es sich bei den Hefen entweder um den Wildtyp oder um Mutanten handelt.
 5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet, dass** es sich bei den Induktoren um Fettsäureester handelt, die ausgewählt sind aus der Gruppe die gebildet wird von Ester der Ölsäure, Ester der Linolsäure, Ester der Linolensäure, Ester der Stearinsäure, speziell Methyloleat, Ethyloleat, Methyllinolat, Ethyllinolat, Methyllinoleat, Ethyllinoleat, Methylstearat und Ethylstearat.
 6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Induktoren in Mengen eingesetzt werden zwischen 0,5 und 2,5 v/v bezogen auf das Fermentationsmedium.
 7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Induktoren gleichzeitig als Kohlenstoffquelle bei der Kultivierung dienen und dann in Mengen eingesetzt werden zwischen 2,5 und 5 v/v bezogen auf das Fermentationsmedium.
 8. Verwendung von Fettsäureestern kurzkettiger einwertiger Alkohole als Induktoren zur Produktion von extrazellulärer Lipase aus Mikroorganismen.
 9. Verwendung nach Anspruch 8, **dadurch gekennzeichnet, dass** es sich bei den Fettsäureestern um Ester handelt, die ausgewählt sind aus der Gruppe die gebildet wird von Ester der Ölsäure, Ester der Linolsäure, Ester der Linolensäure, Ester der Stearinsäure, speziell Methyloleat, Ethyloleat, Methyllinolat, Ethyllinolat, Methyllinoleat, Ethyllinoleat, Methylstearat, Ethylstearat.
 10. Verwendung nach Anspruch 8 und/oder 9, **dadurch gekennzeichnet, dass** es sich bei den Mikroorganismen um Hefen handelt.
 11. Verwendung nach Anspruch 10, **dadurch gekennzeichnet, dass** es sich bei den Hefen um *Yarrowia lipolytica*, *Hansenula canadensis*, *Mucor javanicus*, *Mucor miehei*, *Penicillium roqueforti*, *Rhizopus delemar*, *Penicillium expansum* und *Candida pseudotropicalis*.
 12. Verwendung nach einem der Ansprüche 10 und/oder 11, **dadurch gekennzeichnet, dass** es sich bei den Hefen entweder um den Wildtyp oder um Mutanten handelt.



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung
EP 04 01 0064

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.7)
X	SHIMADA, YUJI ET AL.: "Induction of Geotrichum candidum lipase by long-chain fatty acids" JOURNAL OF FERMENTATION AND BIOENGINEERING, Bd. 74, Nr. 2, - 1992 Seiten 77-80, XP009032773 * Abbildung 1; Tabelle 2 * -----	1-12	C12N1/16 C12N1/26
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.7)
			C12N
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort MÜNCHEN		Abschlußdatum der Recherche 28. Juni 2004	Prüfer Hillenbrand, G
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument			

EPO FORM 1503 03.82 (P04/C03)